

ОСОБЕННОСТИ УТИЛИЗАЦИИ УГЛЕВОДОВ
У ПСИХРОТОЛЕРАНТНЫХ ДРОЖЖЕЙ¹FEATURES OF CARBOHYDRATE
UTILIZATION IN PSYCHROTOLERANT
YEASTS

E. Gribanova

Summary. The work describes the metabolic potential of yeast isolated from various ecosystems of East Antarctica (Enderby Land, MacRobertson Land). For 21 yeast cultures belonging to the genera *Moesziomyces* (2 isolates), *Leucosporidium* (3 isolates), *Naganishia* (1 isolate), *Mycochaetophora* (1 isolate), *Rhodotorula* (3 isolates), *Sporobolomyces* (6 isolates), *Cystobasidium* (2 isolates), *Solicoccozyma* (1 isolate), *Dothiora* (1 isolate), *Glaciozyma* (1 isolate) the ability to utilize glucose, lactose, sucrose, fructose, maltose, mannitol, xylose, rhamnose, galactose, peptone, starch, glycerol under aerobic and anaerobic cultivation conditions was determined. The study of glucose utilization under aerobic and anaerobic conditions showed the presence of predominantly respiratory type metabolism, since carbon dioxide formation did not occur under anaerobic cultivation conditions.

Keywords: psychrophiles, metabolism, fermentation, yeast, Antarctica, carbohydrate utilization, growth kinetics, basidiomycetes, and ascomycetes.

Грибанова Екатерина Александровна

Аспирант, старший преподаватель,
Белорусский государственный университет, г. Минск
lika-den98@mail.ru

Аннотация. В работе описан метаболический потенциал дрожжей, выделенных из различных экосистем Восточной Антарктиды (Земля Эндерби, Земля Мак-Робертсона). Для 21 культуры дрожжей, принадлежащих к родам *Moesziomyces* (2 изолята), *Leucosporidium* (3 изолята), *Naganishia* (1 изолят), *Mycochaetophora* (1 изолят), *Rhodotorula* (3 изолята), *Sporobolomyces* (6 изолятов), *Cystobasidium* (2 изолята), *Solicoccozyma* (1 изолят), *Dothiora* (1 изолят), *Glaciozyma* (1 изолят) была определена способность утилизировать в аэробных и анаэробных условиях культивирования глюкозы, лактозы, сахарозы, фруктозы, мальтозы, маннита, ксилозы, рамнозы, галактозы, пептона, крахмала, глицерина. Исследование утилизации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях показало наличие метаболизма преимущественно дыхательного типа, так как образование углекислого газа в анаэробных условиях культивирования не происходило.

Ключевые слова: психрофилы, метаболизм, брожение, дрожжи, Антарктида, утилизация углеводов, кинетика роста, базидиомицеты, аскомицеты.

Введение

В связи с чутким откликом полярных экосистем на глобальное изменение климата стали особенно актуальны исследования микроорганизмов Антарктиды [1]. Биогеоценозы материка уникальны, поскольку характеризуются чрезвычайно суровым климатом. Установлено, что по показателю биомассы в антарктических почвах и грунтах преобладают грибы [2, 3], изучению которых в этом регионе уделено пока значительно меньше внимания, чем прокариотам. Микобиота Антарктиды выполняет не только свои классические экосистемные функции, включая разложение органического вещества любой сложности и происхождения, но является основой существования для других организмов и даже сообществ, представленных лишайниками, эндолитами, микробными матами и т.д. [4–9]. Антарктические грибы выполняют функцию ранней колонизации скальных обнажений, переводят биоэлементы горных пород

в доступную для других организмов форму, способствуют структурированию местных почв со слабо развитым профилем [10, 11]. Поэтому грибы имеют решающее значение для поддержания равновесия экосистем в Антарктиде [1, 12]. Особенности метаболизма антарктических штаммов грибов позволяют им быть устойчивыми к широкому спектру стрессовых условий и колонизировать все доступные экологические ниши [7, 8, 13, 14].

Дрожжи в антарктических субстратах в основном представлены базидиомицетовым, а не аскомицетовым аффинитетом [15, 16]. К 2012 году в Антарктиде обнаружено 70 видов дрожжей, из них 13 аскомицетов и 57 базидиомицетов [17]. Наиболее обильными для антарктических субстратов являются роды *Bullera*, *Bulleromyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Dioszegia*, *Hyphozyma*, *Leucosporidiella*, *Leucosporidium*, *Mrakia*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* и *Trichosporon* [15–19].

¹ Данная работа была выполнена при поддержке проекта, финансируемого Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований № 20231 168 («Продукция биологически активных веществ психрофильными дрожжами, выделенными из образцов почв Восточной Антарктиды»).

Существование микроорганизмов при отрицательных температурах не лабораторный феномен, а обычное природное явление [20]. В ходе длительной эволюции микроорганизмы, и грибы, в частности, смогли выработать ряд адаптаций к этим условиям. Такие адаптации можно разделить на экологические и физиологические. К экологическим адаптациям можно отнести одну из стратегий развития: эфемерный или сбалансированный (экономный) рост. При сбалансированном развитии грибы, вероятно, вынуждены расти в олиготрофных условиях, не выдерживая конкуренции за субстрат с эфемерами. Таким олиготрофным субстратом зачастую становятся местные горные породы, для колонизации которых литобионтной микобиоте приходится использовать меристематический и дрожжеподобный рост [21]. Ввиду того, что все грибы являются гетеротрофами, в Антарктиде им приходится входить в лишайниковый и эндолитный симбиозы, где микобиота выполняет важные экологические функции, необходимые для выживания всего сообщества в целом [6–8, 22].

Кроме того, микроорганизмы экстремально холодных экосистем для успешного выживания должны обладать широким спектром ферментов для извлечения питательных элементов практически из любого субстрата [23] и синтезировать криопротекторы, например, сахароспирты, многоатомные спирты, белки-антифризы и т. д. [24].

В ходе предварительных исследований нами был выделен 21 изолят дрожжей из образцов гиполитов, эндолитов и таялки Восточной Антарктиды (Земля Эндерби, Земля Мак-Робертсона) и изучены особенности морфологий клеток и колоний, а также физиолого-биохимические свойства [25].

Целью данной работы являлось исследование антарктических дрожжей на способность утилизировать различные источники углерода в аэробных и анаэробных условиях культивирования.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований выступали 21 штамм дрожжей, выделенных из образцов мелкозема Восточной Антарктиды (станция Молодежная, полевая база Гора-Вечерняя (Земля Эндерби), горы Принс-Чарльз (Земля Мак-Робертсона)). Образцы были отобраны участниками Белорусских антарктических экспедиций в период в 2012–2017 гг. (см. таблицу 1). По результатам идентификации культуры дрожжей были депонированы в Белорусскую коллекцию непатогенных микроорганизмов (научной коллекции типовых и промышленно ценных штаммов микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси) [26, 27].

Исследование *окислительной/ферментативной утилизации* углеводов проводили по методу О/Ф-теста с использованием полужидкой среды Хью-Лейфсона, содержащей углеводы (пентозы: ксилоза; гексозы: глюкоза, галактоза, фруктоза, рамноза; дисахариды: лактоза, мальтоза, сахароза; полисахариды: крахмал; спирты: маннит, глицерин) и индикатор pH среды (бромкрезоловый пурпурный) [28].

Изучение *бродильной активности* дрожжей проводили с использованием трубок Дунбара и среды Ридер с 10 % содержанием глюкозы. Об интенсивности брожения судили по количеству вытесненной среды культивирования у запаянного конца трубки [28].

С целью изучения *динамики метаболизма углеводов* использовали многостадийный процесс [28]. Аэробные культуры выращивали при постоянном перемешивании (140 об/мин), анаэробные — покрывали слоем вазелинового масла и инкубировали в стационарных условиях. По полученным данным зависимости оптической плотности от времени культивирования были построены кривые роста исследуемых штаммов дрожжей. Согласно полученным данным, проводили расчёт удельной скорости роста и времени генерации [28].

Определение *концентрации глюкозы* в культуральной жидкости. В качестве реактива на восстанавливающие сахара использовали $K_3[Fe(CN)_6]$, измерения оптической плотности проводили при 440 нм [28]. Для анализа была построена калибровочная кривая. Уравнение линии тренда, согласно графику, имело вид $y=0.151 \cdot x - 0.121$, в то же время величина достоверности аппроксимации близка к 1 (равна 0,9789).

Определение *органических кислот и спиртов*. Органические кислоты (в виде их метиловых эфиров) анализировали методом газовой хроматографии с использованием газового хроматографа Agilent 7820A GC (Agilent Technologies, США), оснащенного пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой ZB-WAX 0,25 мм×30 м×0,25 мкм (полиэтиленгликоль). Анализ содержания органических кислот проводили при скорости потока гелия через колонку 1,32 мл/мин; температуре инжектора — 230 °C, детектора — 275 °C, температуре колонки — 60 °C (1 мин), затем температура колонки повышалась со скоростью 10 °C/мин до 250 °C и выдерживалась 5 мин. Объем анализируемой пробы — 1 мкл. Анализ содержания спиртов проводили при скорости потока гелия через колонку 1,44 мл/мин; температуре инжектора — 220 °C, детектора — 280 °C, температуре колонки — 35 °C (5 мин), затем температура колонки повышалась со скоростью 5 °C /мин до 150 °C и далее со скоростью 20 °C /мин до 250 °C. Объем анализируемой пробы — 0,2 мкл. Идентификацию метиловых эфиров органических кислот проводили по времени удерживания при разделении стандартных смесей метиловых

Таблица 1.

Место отбора образца и физиологические параметры дрожжей Восточной Антарктиды

Таксоны	Коллекционный номер [27]	Температурный диапазон роста (°C) [25]	Место отбора образца	
Basidiomycota	<i>Moesziomyces parantarcticus</i> БИМ Y-380	10–37	гиполиты	Земля Эндерби, станция Молодежная
	<i>Moesziomyces parantarcticus</i> БИМ Y-365	10–37		
	<i>Leucosporidium fragarium</i> БИМ Y-363	4–28		
	<i>Leucosporidium</i> sp. БИМ Y-364	4–28		
	<i>Naganishia</i> sp. БИМ Y-379	4–28	эндолиты	
	<i>Leucosporidium</i> sp. БИМ Y-377	4–28	гиполиты	Земля Мак-Робертсона, горы Принс-Чарльз
	<i>Rhodotorula glutinis</i> БИМ Y-375	4–28		
	<i>Rhodotorula glutinis</i> БИМ Y-376	4–28		
	<i>Rhodotorula glutinis</i> БИМ Y-369	4–28	гиполиты	Земля Эндерби, полевая база Гора Вечерняя
	<i>Sporobolomyces phaffii</i> БИМ Y-378	4–28		
	<i>Sporobolomyces phaffii</i> БИМ Y-367	4–28		
	<i>Sporobolomyces phaffii</i> БИМ Y-374	4–28		
	<i>Sporobolomyces phaffii</i> БИМ Y-370	4–28		
	<i>Sporobolomyces phaffii</i> БИМ Y-371	4–28		
	<i>Sporobolomyces phaffii</i> БИМ Y-372	4–28		
	<i>Cystobasidium ritchiei</i> БИМ Y-366	4–22		
	<i>Cystobasidium ritchiei</i> БИМ Y-368	4–22		
	<i>Solicoccozyma terricola</i> БИМ Y-373	4–22	гиполиты	Земля Эндерби, станция Молодежная
	<i>Glaciozyma antarctica</i> БИМ Y-381	4–10	таялка	Земля Эндерби, холмы Тала, мыс возле бухты Лазурная
Ascomycota	<i>Dothiora cannabinae</i> БИМ Y-383	4–32	гиполиты	Земля Эндерби, холмы Тала, мыс Гнездовой
	<i>Mycochaetophora gentianae</i> БИМ Y-382	4–28	эндолиты	Земля Эндерби, станция Молодежная

эфиров этих веществ и их содержание в образце оценивали по методу внутренней нормализации. Идентификацию спиртов проводили по времени удерживания при разделении их стандартных образцов.

В качестве контроля во всех опытах использовали штамм *Saccharomyces cerevisiae* из коллекции культур кафедры микробиологии биологического факультета БГУ.

Результаты и их обсуждение

Исследование окислительной/ферментативной утилизации углеводов (О/Ф тест) проводили с использованием среды Хью-Лейфсона, индикатора pH среды и с добавлением различных источников углеводов. Из-

менение окраски среды в результате образования кислых и щелочных продуктов метаболизма детектировали в течение трех недель (см. таблицу 2).

Анализируя полученные результаты, было выявлено, что пентозы были мало доступны для психротолерантных дрожжей, ввиду чего только 10 из 21 культуры смогли утилизировать её с образованием кислых и щелочных продуктов метаболизма. При утилизации гексоз в большинстве случаев образовывались кислые продукты метаболизма, за исключением рамнозы, при росте на которой 13 штаммов дрожжей образовывали щелочные продукты. Следует отметить, что наиболее доступным углеводом была выявлена глюкоза, при этом наилучший эффект был выявлен при одновременном добавлении

Таблица 2.
Результаты утилизации углеводов изолятами дрожжей в полужидких питательных средах

Углеводы	Исследуемые культуры																		Итого										
	пентозы	ксилоза	аэробное/брожение	<i>M. parantarcticus</i> БИМ Y-380	<i>M. parantarcticus</i> БИМ Y-365	<i>L. fragarium</i> БИМ Y-363	<i>Leucosporidium</i> sp. БИМ Y-364	<i>Leucosporidium</i> sp. БИМ Y-377	<i>Naganishia</i> sp. БИМ Y-379	<i>Rh. glutinis</i> БИМ Y-375	<i>Rh. glutinis</i> БИМ Y-376	<i>Rh. glutinis</i> БИМ Y-369	<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-378	<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-367	<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-374	<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-370	<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-371	<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-372		<i>C. richiei</i> БИМ Y-366	<i>C. richiei</i> БИМ Y-368	<i>S. terricola</i> БИМ Y-373	<i>Gl. antarctica</i> БИМ Y-381	<i>D. canabinae</i> БИМ Y-383	<i>M. gentianaе</i> БИМ Y-382	кислая	щелочная		
пентозы	ксилоза	аэробное	4	6	-	-	-	20	6	11	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	15	4	6	9	1		
		анаэробное	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	11	2	-		
	глюкоза и пептон	аэробное	6	6	6	1	1	1	1	0,5	1	1	2	2	1	2	1	1	1	0,5	1	0,5	0,5	2	6	21	-		
		анаэробное	12	12	1	9	1	0,5	1	0,5	1	1	6	1	1	1	6	1	1	1	1	0,5	0,5	6	6	21	-		
гексозы	глюкоза без пептона	аэробное	-	-	3	3	3	3	5	3	-	-	1	-	-	-	-	4	5	3	-	7	-	-	10	11	-		
		анаэробное	-	-	3	3	3	3	1	3	-	-	1	-	-	-	-	3	4	3	-	1	-	-	10	11	-		
	пептон без глюкозы	аэробное	-	-	6	6	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	6	6	9	6	6	2	6	5	6		
		анаэробное	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	6	-	6	-	-	6	5	-		
гексозы	галактоза	аэробное	7	7	-	-	-	-	-	20	20	-	-	-	-	-	-	-	-	16	20	9	7	-	16	3	10	-	
		анаэробное	20	20	10	10	7	7	7	9	9	7	9	7	9	7	7	7	9	7	7	7	13	7	2	21	-		
	фруктоза	аэробное	7	5	7	12	-	-	12	5	5	5	-	-	-	-	-	12	-	-	-	12	9	5	5	11	1		
		анаэробное	-	-	-	-	-	-	12	10	12	12	-	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	11	14	6	-		
дисахариды	рамноза	аэробное	9	9	9	9	9	-	-	6	2	9	9	9	9	9	-	-	-	-	11	11	16	7	7	4	13		
		анаэробное	-	-	-	-	-	-	-	-	7	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9	4	-		
	лактоза	аэробное	6	6	9	16	-	-	9	12	-	-	-	9	12	-	-	12	7	-	-	-	7	12	10	6	7		
		анаэробное	8	8	9	9	9	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	16	-	7	10	9	1		
дисахариды	мальтоза	аэробное	5	5	5	5	7	7	7	3	3	5	5	7	5	5	5	5	-	10	9	7	-	4	5	17	2		
		анаэробное	-	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	12	3	-		
	сахароза	аэробное	5	5	5	5	5	3	5	3	3	5	5	5	4	5	5	5	7	12	12	5	9	3	5	18	3		
		анаэробное	-	-	12	-	12	7	7	5	5	12	12	10	7	14	12	-	-	-	-	-	-	-	7	9	13	-	

полисахариды	крахмал	аэр	–	–	3	3	–	8	3	3	11	–	–	11	8	4	8	8	18	4	6	10
		ан	–	–	–	–	–	4	–	–	4	2	2	8	8	4	–	–	8	4	10	–
спирты	маннит	аэр	11	11	11	11	–	–	6	6	11	11	6	11	11	–	–	–	6	11	14	–
		ан	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
глицерин		аэр	7	7	10	10	10	–	7	7	9	–	–	11	11	–	6	8	–	5	11	4
		ан	20	20	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	9	–	–	11	6	–

Количество углеводов, которые каждая культура может утилизировать с образованием кислых и щелочных продуктов

кислое	аэр	9	9	6	7	5	6	10	9	7	7	5	4	7	7	7	4	4	8	2	11	12
щелочное	аэр	1	1	5	4	2	3	2	1	1	1	2	2	1	1	2	4	4	2	7	–	1
кислое	ан	4	4	5	4	5	8	6	5	5	5	4	4	5	7	6	5	3	5	2	9	12
щелочное	ан	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–

Примечание: цифрами обозначены сутки культивирования, на которые наблюдали изменение рН среды.

Условные обозначения:

нет изменений от контроля	–	синий
желтый		слабо синий
слабо желтый		варианты исходного
очень слабо желтый		

и углеводов и дополнительного источника аминокислот (пептона) в среду для культивирования. Доступность дисахаридов для утилизации уменьшалась в ряду сахара, мальтоза, лактоза преимущественно в аэробных условиях культивирования. При утилизации полисахаридов в аэробных условиях образовывались преимущественно щелочные продукты, а в анаэробных — кислые.

Среди исследуемых спиртов, более доступным для утилизации был выявлен шестиатомный спирт глицерин, при этом утилизация спиртов наблюдалась преимущественно в аэробных условиях.

Подытоживая, следует отметить что **наибольшей** метаболической активностью в **аэробных** условиях обладали культуры *M. gentianae* БИМ Y-382 (13 углеводов), *Rh. glutinis* БИМ Y-375 (12), *D. cannabinae* БИМ Y-383, *L. fragarium* БИМ Y-363 и *Leucosporidium* sp. БИМ Y-364 (11), *M. parantarcticus* БИМ Y-380, *M. parantarcticus* БИМ Y-365, *Rh. glutinis* БИМ Y-376 и *S. terricola* БИМ Y-373 (10); **наибольшей** метаболической активностью в **анаэробных** условиях обладали культуры *M. gentianae* БИМ Y-382 (12), *D. cannabinae* БИМ Y-383 (9), *Naganishia* sp. БИМ Y-379 (8). К брожению с образованием щелочных продуктов способна только культура *S. terricola* БИМ Y-373 (брожение лактозы).

Исследование бродильной активности в трубках Дунбара

Данный опыт проводили с использованием трубок Дунбара, в которых при брожении в закрытом колене скапливался газ, по объему которого определяли наличие/отсутствие бродильной активности с образованием углекислого газа. В исследованиях использовали глюкозу в качестве источника углевода.

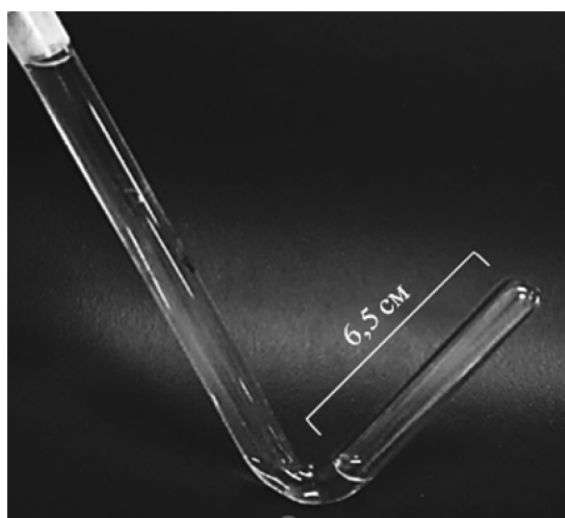
На первые сутки культивирования положительная реакция наблюдалась только у контрольной культуры — 6,5 см столбик CO_2 (см. рисунок 1 (А)). На десятые сутки опыта у антарктических дрожжей не было выявлено положительной реакции, изоляты показали рост либо на границе раздела фаз воздух/жидкость, либо у разделительного колена (см. рисунок 1 (Б)).

Данные результаты свидетельствуют о том, что в жидкой среде, содержащей только углерод и соли, все исследуемые антарктические изоляты дрожжей не способны сбраживать углерод с образованием газообразных продуктов. Дополнительно были проведены исследования с другими углеводами, при росте на которых в О/Ф тесте в анаэробных условиях изменялось рН среды — положительных результатов не наблюдалось.

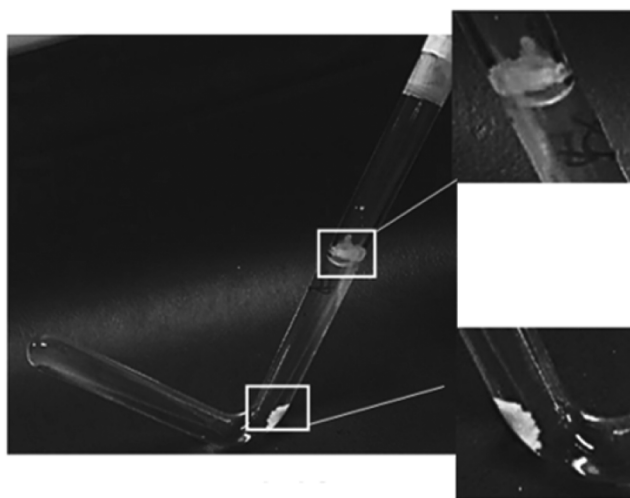
Изучение метаболизма дрожжей в аэробных и анаэробных условиях культивирования

В исследованиях динамики роста антарктических штаммов дрожжей в жидкой питательной среде использовали углеводы, с которыми был показан рост и изменение рН среды у всех исследуемых штаммов (глюкозу, сахарозу и галактозу в концентрации 2 %).

Графическая зависимость оптической плотности культуральной жидкости от времени имела сигмоидальную форму, что является типичной кривой роста дрожжевых штаммов. По мере роста антарктических дрожжей происходило накопление вторичных продуктов метаболизма (органические кислоты, спирты и т.д.), которые изменяли показатель кислотности сред (рН) и, в зависимости от исследуемого углевода, происходило изменение темпов роста дрожжей (см. таблицу 3). Следует отметить, что изменение показателей рН среды в кислую или щелочную сторону при росте в жидкой питательной



А



Б

Рис. 1. Исследование бродильной активности в трубках Дунбара: А — *S. cerevisiae*, Б — *Rh. glutinis* БИМ Y-376

Таблица 3.

Определение динамических показателей роста
антарктических штаммов дрожжей на разных углеводах

№	Штаммы дрожжей	пара- метры	углеводы, 2 %		
			глюкоза	галак- тоза	сахароза
1	<i>M. parantarcticus</i> БИМ Y-380	g	5,142	8,472	6,126
		pH	2,74	2,54	2,52
2	<i>M. parantarcticus</i> БИМ Y-365	g	8,583	7,587	5,703
		pH	2,55	2,52	2,43
3	<i>Naganishia</i> sp. БИМ Y-379	g	6,761	13,161	6,365
		pH	2,47	5,59	2,52
4	<i>L. fragarium</i> БИМ Y-363	g	4,952	8,618	7,851
		pH	3,42	5,68	2,43
5	<i>Leucosporidium</i> sp. БИМ Y-364	g	7,420	9,772	7,948
		pH	3,23	6,07	2,41
6	<i>Leucosporidium</i> sp. БИМ Y-377	g	7,104	16,506	7,501
		pH	3,17	6,45	2,36
7	<i>Rh. glutinis</i> БИМ Y-375	g	6,174	7,305	4,998
		pH	3,12	2,44	2,24
8	<i>Rh. glutinis</i> БИМ Y-376	g	6,741	7,258	4,724
		pH	3,11	2,43	2,21
9	<i>Rh. glutinis</i> БИМ Y-369	g	14,642	10,564	6,441
		pH	2,80	6,37	2,22
10	<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-378	g	6,081	11,447	7,492
		pH	2,72	6,27	2,16
11	<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-367	g	6,906	12,194	6,426
		pH	2,70	6,31	2,20
12	<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-374	g	17,657	13,076	9,351
		pH	3,04	6,54	2,24
13	<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-370	g	17,483	13,386	7,172
		pH	3,23	6,47	2,47
14	<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-371	g	13,344	10,524	6,033
		pH	2,88	6,23	2,17
15	<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-372	g	6,050	17,953	7,113
		pH	3,67	3,63	3,50

№	Штаммы дрожжей	пара- метры	углеводы, 2 %		
			глюкоза	галак- тоза	сахароза
16	<i>C. ritchiei</i> БИМ Y-366	g	12,805	9,238	7,679
		pH	3,93	4,54	6,58
17	<i>C. ritchiei</i> БИМ Y-368	g	10,909	10,479	8,729
		pH	4,18	4,46	6,62
18	<i>S. terricola</i> БИМ Y-373	g	6,293	7,739	7,630
		pH	3,53	2,76	2,50
19	<i>D. cannabinae</i> БИМ Y-383	g	—	—	—
		pH	2,77	2,93	2,36
20	<i>M. gentianae</i> БИМ Y-382	g	—	—	—
		pH	2,50	2,30	2,15

Примечание: «g» — время генерации (кл/ч), «pH» — последний определенный показатель кислотности среды в условиях опыта; «-» — время генерации не рассчитывалось ввиду мицелиального роста штаммов; *Gl. antarctica* БИМ Y-381 в данных исследованиях не была использована ввиду отсутствия в доступе оборудования, оптимального для выращивания психрофильных культур.

среде совпадало с направлением изменения pH среды, полученным при росте в полужидкой питательной среде O/F теста.

Единого варианта изменения времени генерации между используемыми углеводами не было выявлено: у 7 штаммов происходило увеличение времени генерации в ряду глюкоза-сахароза-галактоза (*M. parantarcticus* БИМ Y-380, *L. fragarium* БИМ Y-363, *Leucosporidium* sp. БИМ Y-364, *Leucosporidium* sp. БИМ Y-377, *Sp. phaffii* БИМ Y-378, *Sp. phaffii* БИМ Y-372, *S. terricola* БИМ Y-373), у 6 культур в обратном ряду сахароза-галактоза-глюкоза (*Rh. glutinis* БИМ Y-369, *Sp. phaffii* БИМ Y-374, *Sp. phaffii* БИМ Y-370, *Sp. phaffii* БИМ Y-371, *C. ritchiei* БИМ Y-366, *C. ritchiei* БИМ Y-368), у 5 культур в ряду сахароза-глюкоза-галактоза (*M. parantarcticus* БИМ Y-365, *Naganishia* sp. БИМ Y-379, *Rh. glutinis* БИМ Y-375, *Rh. glutinis* БИМ Y-376, *Sp. phaffii* БИМ Y-367). При этом штаммы с одинаковой родовой принадлежностью находились в разных группах.

Следует отметить, что в условиях опыта минимальное время генерации при росте на углеводах у большинства штаммов учитывалось в первые 24 часа культивирования. Основное изменение показателей pH культуральной среды происходило в течение 24–48 часов культивирования дрожжей, дальнейшие изменения постепенно выходили на плато.

При анализе полученных результатов о росте культур на жидких и полужидких средах с глюкозой в качестве единственного источника углевода, **наиболее перспективными** в качестве продуцентов кислых продуктов метаболизма являлись культуры *Naganishia* sp. БИМ Y-379, *Rh. glutinis* БИМ Y-375, *D. cannabinae* БИМ Y-383, *M. parantarcticus* БИМ Y-380, *M. parantarcticus* БИМ Y-365, *Rh. glutinis* БИМ Y-376, *Sp. phaffii* БИМ Y-367, *Rh. glutinis* БИМ Y-369, *Sp. phaffii* БИМ Y-371 ввиду того, что основное падению значений pH среды наблюдалось уже в течение первых суток культивирования.

Согласно уравнению линии тренда, для снижения pH среды до значений 2,5–4, за счет образования кислых продуктов метаболизма в аэробных условиях культивирования, исследуемым штаммам необходимо утилизировать следующее количество глюкозы:

10–20 %	<i>C. ritchiei</i> БИМ Y-368
20–30 %	<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-372
30–40 %	<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-370, <i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-374, <i>L. fragarium</i> БИМ Y-363
40–50 %	<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-371, <i>Rh. glutinis</i> БИМ Y-369, <i>S. terricola</i> БИМ Y-373, <i>C. ritchiei</i> БИМ Y-366, <i>Rh. glutinis</i> БИМ Y-375, <i>M. parantarcticus</i> БИМ Y-380
50–60 %	<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-378, <i>Leucosporidium</i> sp. БИМ Y-364, <i>M. parantarcticus</i> БИМ Y-365, <i>Naganishia</i> sp. БИМ Y-379
60–70 %	<i>M. gentianaе</i> БИМ Y-382, <i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-367
70–80 %	<i>D. cannabinae</i> БИМ Y-383, <i>Leucosporidium</i> sp. БИМ Y-377, <i>Rh. glutinis</i> БИМ Y-376

Наиболее **метаболически активными** были штаммы *D. cannabinae* БИМ Y-383, *Leucosporidium* sp. БИМ Y-377, *Rh. glutinis* БИМ Y-376, потребив более 70 % глюкозы. Большинство культур при утилизации глюкозы потребляет от 30 % до 60 % глюкозы с образованием кислых продуктов метаболизма.

Исследование утилизации глюкозы в анаэробных условиях культивирования

Как было сказано ранее, исследуемые штаммы антарктических дрожжей обладают метаболизмом преимущественно дыхательного типа и не способны осуществлять спиртовое брожение с выделением углекислого газа.

Для создания анаэробных условий поверх питательной среды настилали стерильное вазелиновое масло. Для работы были отобраны ряд штаммов дрожжей, утилизация глюкозы у которых происходила наиболее интенсивно в условиях разной аэрации, согласно результатам О/Ф теста (см. таблицу 4).

Таблица 4.

Изменения pH культуральной жидкости при анаэробной утилизации глюкозы (10 %)

Штаммы дрожжей	Время культивирования, ч		Температура культивирования, °C
	0	552	
<i>Naganishia</i> sp. БИМ Y-379	5,6–5,8	3,76	18
<i>L. fragarium</i> БИМ Y-363		5,17	18
<i>Leucosporidium</i> sp. БИМ Y-377		4,83	18
<i>Rh. glutinis</i> БИМ Y-375		3,47	18
<i>Rh. glutinis</i> БИМ Y-376		4,59	18
<i>Rh. glutinis</i> БИМ Y-369		4,44	18
<i>C. ritchiei</i> БИМ Y-366		4,63	18
<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-367		3,43	18
<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-371		4,37	18
<i>Sp. phaffii</i> БИМ Y-372		4,95	18
<i>S. terricola</i> БИМ Y-373		3,64	18
<i>Gl. antarctica</i> БИМ Y-381		5,08	10
<i>D. cannabinae</i> БИМ Y-383		4,83	22
<i>M. gentianaе</i> БИМ Y-382		4,63	28

Согласно литературным данным, в процессе брожения увеличения биомассы клеток не происходит, тоже касается и удельной скорости роста, которая остается на низком уровне на всем протяжении процессов брожения [28].

Газожидкостная хроматография

Продукты аэробной и анаэробной утилизации глюкозы культур *Naganishia* sp. БИМ Y-379 и *Rh. glutinis* БИМ Y-375 были взяты для проведения ГЖХ анализа (см. таблицу 5), так как падение значений pH на единицу и более происходило уже через 1 и 7 суток культивирования соответственно, чего не было выявлено у других исследуемых штаммов.

Качественный анализ кислот осуществляли методом добавочной пробы по времени удерживания. В экспериментах проверяли наличие следующих кислот: лимонная, яблочная, малоновая и уксусная.

Согласно результатам, штамм *Naganishia* sp. БИМ Y-379 накапливал все 4 исследуемые кислоты как в аэробных, так и анаэробных условиях (см. таблицу 5). Однако яблочной и лимонной кислоты образуется больше в анаэробных условиях. Дрожжи *Rh. glutinis* БИМ Y-375

Таблица 5.
Определение органических кислот и спиртов методом ГЖХ

Продукты метаболизма		Условия культивирования			
		<i>Rh. glutinis</i> БИМ Y-375		<i>Naganishia</i> sp. БИМ Y-379	
		аэробные	анаэробные	аэробные	анаэробные
Кислоты, %*	яблочная	6,366	9,031	11,447	15,670
	уксусная	3,318	3,326	8,739	8,198
	лимонная	1,398	6,589	2,540	4,874
	малоновая	0,105	1,089	0,907	0,755
Спирты, µg/ml	метанол	—	1,42028	—	3,81039
	этанол	9,22667	11,37744	3,14486	22,94434
	изопропанол	8,02016	5,32326	6,08598	3,27863
	пропанол	—	—	—	—
	изобутанол	—	—	—	4,90043
	бутанол	—	—	—	—
	изоамиловый спирт	—	3,47212	—	4,76252

Примечание: «*» — содержание кислот в пробе, от общего количества обнаруженных веществ.

в анаэробных условиях накапливали больше яблочной, лимонной и малоновой кислот (см. таблицу 5).

Результаты, свидетельствовали о том, что оба исследуемых штамма способны накапливать в процессе утилизации глюкозы этанол, при этом в анаэробных условиях его образуется на порядок больше (у *Naganishia* sp. БИМ Y-379). Продукты брожения у обеих культур схожи с теми, которые обычно образуются при спиртовом брожении, но результаты исследований брожения с использованием трубок Дунбара не выявили образования углекислого газа.

Заключения

В исследовании проводился анализ способности утилизировать в аэробных и анаэробных условиях культивирования ряд углеводов антарктическими штаммами дрожжей, которые были выделены из различных экосистем Восточной Антарктиды. Проведенное исследование антарктических штаммов дрожжей выявило наличие метаболизма преимущественно дыхательного типа. Исследование спектра продуцируемых веществ методом газожидкостной хроматографии позволило выявить продукцию малоновой, яблочной, лимонной и уксусной кислот в аэробных и анаэробных условиях культивирования, а также этанола и изопропанола в аэробных условиях, метанола, этанола, изопропанола, изобутанола и изоамилового спирта в анаэробных условиях культивирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rosa L.H. Fungi in Antarctica: diversity, ecology, effects of climate change, and bioprospection for bioactive compounds. / L.H. Rosa, C.L. Zani, C.L. Cantrell [et al.] // Fungi of Antarctica. Springer, Cham. — 2019. — P. 1–17.
2. Selbmann L. Black yeasts in cold habitats. / L. Selbmann, G.S. de Hoog, L. Zucconi [et al.] // In: Cold-adapted yeasts. Springer, Berlin, Heidelberg. — 2014. — P. 173–189.
3. Gomes E.C. Q. Fungi present in soils of Antarctica. / E.C.Q. Gomes, H.M. Figueredo, F.S. de Oliveira [et al.] // Fungi of Antarctica. Springer, Cham. — 2019. — P. 43–67.
4. Brunati M. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. / M. Brunati, J.L. Rojas, F. Sponga [et al.] // Marine genomics. — 2009. — V. 2 (1). — P. 43–50.
5. Furbino L.E. Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. / L.E. Furbino, V.M. Godinho, I.F. Santiago [et al.] // Microbial ecology. — 2014. — V. 67 (4). — P. 775–787.
6. Archer S. D. Endolithic microbial diversity in sandstone and granite from the McMurdo Dry Valleys, / S.D. Archer, A. de los Ríos, K.C. Lee [et al.] // Antarctica. Polar Biol. — 2017. — V. 40 (5). — P. 997–1006.
7. Coleine C. Sun exposure shapes functional grouping of fungi in cryptoendolithic Antarctic communities. / C. Coleine, L. Zucconi, S. Onofri [et al.] // Life. — 2018. — V. 8 (2). — P. 19.
8. Coleine C. Endolithic fungal species markers for harshest conditions in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. / C. Coleine, N. Pombubpa, L. Zucconi [et al.] // Life. — 2020. — V. 10 (2). — P. 13.
9. Meslier V. Endolithic microbial communities as model systems for ecology and astrobiology. / V. Meslier, J. DiRuggiero // Model Ecosystems in Extreme Environments. Academic Press. — 2019. — P. 145–168.
10. Onofri S. Rock-inhabiting fungi and their role in deterioration of stone monuments in the Mediterranean area. / S. Onofri, L. Zucconi, D. Isola [et al.] // Plant Biosystems. — 2014. — V. 148 (2). — P. 384–391.
11. Yeager C.M. Life on the edge: microbes in rock Varnish. / C.M. Yeager // Los Alamos National Lab. (LANL), Los Alamos, — 2019.
12. Arenz B.E. Fungal diversity in Antarctic soils. / B.E. Arenz, R.A. Blanchette, R.L. Farrell // Antarctic terrestrial microbiology. Springer, Berlin, Heidelberg. — 2014. — P. 35–53.

13. Ruisi S. Fungi in Antarctica. / S. Ruisi, D. Barreca, L. Selbmann [et al.] // *Revs Envir. Sci. Bio/Tech.* — 2007. — V. 6 (1–3). — P. 127–141.
14. da Silva T.H. Antarctic permafrost: an unexplored fungal microhabitat at the edge of life. / T.H. da Silva, D.A.S. Silva, A. Thomazini [et al.] // *Fungi of Antarctica.* Springer, Cham. — 2019. — P. 147–164.
15. Shivaji S. Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. / S. Shivaji, G.S. Prasad // *Yeast biotechnology: Diversity and applications.* Springer, Dordrecht, — 2009. — P. 3–18.
16. Connell L.B. Cold-adapted yeasts in Antarctic deserts. / L.B. Connell, R.R. Rodriguez, R.S. Redman [et al.] // *Cold-adapted yeasts.* Springer, Berlin, Heidelberg. — 2014. — P. 75–98.
17. Buzzini P. Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. / P. Buzzini, E. Branda, M. Goretti [et al.] // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 2012. — V. 82 (2). — P. 217–241.
18. Frisvad J. C. Fungi in cold ecosystems. / J.C. Frisvad // *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology.* Springer, Berlin, Heidelberg, — 2008. — P. 137–156.
19. Zhang T. Diversity and cold adaptation of culturable endophytic fungi from bryophytes in the Fildes Region, King George Island, maritime Antarctica. / T. Zhang, Y.Q. Zhang, H.Y. Liu [et al.] // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2013. — V. 341 (1). — P. 52–61.
20. Panikov N.S. Subzero activity of cold-adapted yeasts. / N.S. Panikov // *Cold-adapted Yeasts.* Springer, Berlin, Heidelberg, — 2014. — P. 295–323.
21. Selbmann L. Antarctic epilithic lichens as niches for black meristematic fungi. / L. Selbmann, M. Grube, S. Onofri [et al.] // *Biology.* — 2013. — V. 2 (2). — P. 784–797.
22. Yung C.C. Characterization of chasmoendolithic community in miers valley, Mcmurdo dry valleys, antarctica. / C.C. Yung, Y. Chan, D.C. Lacap [et al.] // *Microbial Ecol.* — 2014. — V. 68 (2). — P. 351–359.
23. Panikov N.S., Microbial activity in soils frozen to below -39°C . / N.S. Panikov, P.W. Flanagan, W.C. Oechel [et al.] // *Soil Biol. Biochem.* — 2006. — V. 38 (4). — P. 785–794.
24. Никитин Д.А. Экологические особенности грибов Антарктиды / Д.А. Никитин // *Микология и фитопатология.* — 2021. — Т. 55. — № 2. — С. 79–104.
25. Gribanova E.A. Physiological and biochemical traits of yeasts from soils of various ecosystems of East Antarctica / E.A. Gribanova, V.E. Miamin // *Ukrainian Antarctic journal.* — 2021. — № 2. — P. 106–116.
26. Грибанова Е.А. Молекулярно-биологическая идентификация дрожжей, выделенных из различных экосистем Восточной Антарктики / Е.А. Грибанова, Е.В. Охремчук, А.Е. Семенчукова, Ю.Г. Гигиняк, В.Е. Мямин // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты, Минск, 6–9 июня 2023 г.: материалы XIII Междунар. научн. конф. / орг. ком. конф.: А.А. Шепшелев (пред.) и [др.].* — Минск: Беларуская навука, 2023. — С. 39–40.
27. Грибанова Е.А. Разнообразие и биотехнологический потенциал дрожжей, выделенных из различных экосистем Восточной Антарктиды / Е.А. Грибанова, Е.В. Охремчук, А.Е. Семенчукова, В.Е. Мямин // *Природная среда Антарктики: сб. материалов V Международной научно-практической конференции, аг. Каменюки, Брестская область, 25–27 сент. 2024 г. / редкол.: В.Ф. Логинов, С.А. Лысенко, В.А. Рыжиков, Ю.Г. Гигиняк.* — Минск: ИВЦ Минфина, 2024. — С. 90–93.
28. Качмазов Г.С. Дрожжи бродительных производств. Практическое руководство. — 2012.

© Грибанова Екатерина Александровна (lika-den98@mail.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»